



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 101 08 211.8

Anmeldetag: 20. Februar 2001

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Verwendung von Fusionsproteinen deren N-termi-
naler Anteil aus einem Hirudinderivat besteht zur
Herstellung rekombinanter Proteine über Sekretion
durch Hefen

IPC: C 12 N 15/81

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 20. September 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

Verwendung von Fusionsproteinen deren N- terminaler Anteil aus einem
Hirudinderivat besteht zur Herstellung rekombinanter Proteine über Sekretion durch
5 Hefen

Beschreibung

Die Entwicklung von optimierten Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln auf der
10 Basis rekombinanter Proteine stellt eine Aufgabe dar, die folgenden Gesichtspunkten
gerecht werden muß. Zum einen soll ein Verfahren möglichst kostengünstig sein und
zum anderen soll das Produkt von höchster Reinheit sein. Die Wahl des
Expressionssystems bestimmt dabei den Weg des jeweiligen
Herstellungsprozesses, wobei dem Fachmann klar ist, daß durch die Entwicklung
15 neuer proteinchemischer Techniken und die Vielfalt der biochemischen
Möglichkeiten und die Neukombination bekannter Techniken stets Verbesserungen
bestehender Verfahren möglich sind. Die Expression solch relevanter Proteine in
Hefen findet dabei breite Anwendung.

20 Die Herstellung von Proteinen wie Insulin, GM- CSF (Leukine[®]) und Hirudin
(Refludan[®]) sind Beispiele für die erfolgreiche Entwicklung gentechnischer
Verfahren, die die Synthese des jeweiligen Proteins oder Vorläufern davon in Hefe
als Grundlage haben. Besonders Hirudine lassen sich allgemein durch Hefen mit
guten Ausbeuten, die bei Verwendung von Hansenula polymorpha (Weydemann et
25 al. Appl. Microbiol Biotechnol. 44: 377 –385, 1995) oder Pichia pastoris (Rosenfeld
et. al. Protein Expr. Purif :4 , 476 –82, 1996) sich im Grammaßstab bewegen, direkt
synthetisieren.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß Fusionsproteine , die N- terminal Hirudin
30 oder Hirudinderivate enthalten mit ähnlich guten Ausbeuten aus Hefen
ausgeschleust werden wie Hirudin selbst. Die Ausbeuten beziehen sich dabei auf
Molarität. Dies bedeutet, daß wenn man mit einem Wirts/Vektorsystem Ausbeuten
von 100mg pro Liter natives Hirudin erzielt, man mit diesem System ca . 180 mg
pro Liter Fusionsprotein aus Hirudin und z.B. Miniproinsulin, wie es in EP-A 0 347

781 beschrieben ist, erzielen kann. Überraschend ist dabei Hirudin biologisch aktiv und das Miniproinsulin liegt korrekt räumlich gefaltet vor. Fusioniert man beide Proteine über ein Brückenglied aus Aminosäuren, die spezifisch durch Endoproteasen erkannt werden, die das Fusionsprotein an keiner anderen Stelle effizient spalten, so läßt sich das Protein von Interesse direkt aktiv abspalten. Im Falle der Herstellung von Insulin enthält das Brückenglied zwischen Hirudin und Miniproinsulin vorzugsweis am carboxyterminalen Ende ein Arginin. In einer simultanen Prozessierung kann dann bei Umsetzung mit Trypsin der Fusionsteil abgespalten und Proinsulin zu Mon –Arg – Insulin umgewandelt werden.

Gegenstand der Erfindung ist also ein Fusionsprotein aus Hirudin oder einem Hirudinderivat als Bestandteil einer Expressionskassette der Form :

$P_x - S_x - B_n - (ZR) - \text{Hir} (As_m R) - \text{Protein} (Y) - T ;$

wobei die Expressionskassette dadurch gekennzeichnet ist , daß sie für Hirudin oder ein Hirudinderivat kodiert, das über eine Sequenz $As_m R$ mit einem Protein Y ein Fusionsprotein bildet. Dabei gilt :

P_x entspricht einer beliebigen Promotor – DNA - Sequenz, die so ausgewählt wird, das optimale Ausbeuten an Wertprotein erzielbar werden;

S_x entspricht einer beliebigen DNA die entsprechend eine beliebige Signal bzw. Leadersequenz, die optimale Ausbeuten erlaubt, kodiert;

B_n entspricht 1-15 genetisch kodierten Aminosäuren oder einer chemischen Bindung;

Z entspricht dem Codon einer Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg;

R entspricht einem Codon für Arg;

As_m entspricht einer chemischen Bindung oder mit $m = 1-10$ genetisch kodierten Aminosäuren;

Hir entspricht einer DNA – Sequenz , die für Hirudin oder einem Derivat des

Hirudin, das mindesten 40% Homologie zu natürlichem Hirudin aufweist , kodiert;

Protein Y entspricht einer DNA – Sequenz , die ein beliebiges in Hefe herstellbares und sekretierbares Protein kodiert;

T entspricht einer nicht translatierten DNA – Sequenz, die sich vorteilhaft auf die Expression auswirkt.

Bevorzugt als Protein Y sind Polypeptide wie Miniproinsulinderivate, Interleukine oder Lymphokine bzw. Interferone. Die Expressionskassette wird vorzugsweise in Hefen wie *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *H. polymorpha* oder *P. pastoris* eingeführt. Dabei
 5 kann sie stabil in einer oder mehreren Kopien in das jeweilige Hefegenom integriert sein oder extrachromosomal auf einem „Multi-copy vector“ vorliegen.

Das im folgenden beschriebene Expressionssystem dient dafür als Beispiel. Es ist dem Fachmann klar, daß, um die Expressionskassette in dieses ausgewählte
 10 System einzuführen, je nach Art des ausgewählten Wirtssystems die entsprechenden Konstruktionen rekombinanter DNA vorzunehmen sind. Entsprechend kann die großtechnische Fermentation im Hinblick auf das ausgewählte Wirts / Vektorsystem optimiert werden.

15 Blutegel vom Typ *Hirudo* entwickelten z.B. verschiedene Isoformen des Thrombininhibitors Hirudin. Durch künstliche Variation des Moleküls, z.B. Austausch der N-terminalen Aminosäure, wurde Hirudin für pharmazeutisch technische Anforderungen optimiert (z.B. EP 0 324 712). Die Erfindung beinhaltet die Verwendung von Hirudin und Hirudinvarianten. In besonderen Ausführungsformen
 20 der Erfindung wird eine der natürlichen Isoformen des Hirudins (die natürlichen Isoformen werden zusammen als „Hirudin“ bezeichnet) verwendet. Eine natürliche Isoform ist z.B. Val-Val-Hirudin oder Ile-Thr – Hirudin. In anderen Ausführungsformen der Erfindung wird eine Variante einer natürlichen Hirudin Isoform eingesetzt. Eine Variante leitet sich von einer natürlichen Isoform des
 25 Hirudins ab, enthält aber z.B. zusätzliche Aminosäuren und/oder Aminosäuredeletionen und/oder Aminosäureaustausche im Vergleich zu der natürlichen Isoform. Eine Variante von Hirudin kann alternierend Peptidabschnitte natürlicher Isoformen des Hirudins und neue Aminosäuren enthalten. Varianten des Hirudins sind bekannt und z.B. in DE 3 430 556 beschrieben. Varianten des Hirudins
 30 sind als Protein kommerziell erhältlich (Firma Calbiochem Biochemicals, Cat.no.377-853, -950-960).

Fusionsproteine mit Hirudin sind im sauren Milieu häufig überraschend gut löslich. Daraus ergeben sich deutliche Vorteile bzgl. der proteinchemischen Aufarbeitung.

Zum einen werden die viele Komponenten des Überstandes unter diesen Bedingungen ausgefällt und zum anderen sind die meisten Peptidasen oder Proteasen inaktiv. Durch Ansäuern der Fermentationsbrühe am Ende des Arbeitsganges können somit unerwünschte Überstandsproteine direkt mit den Wirtszellen von dem Fusionsprotein separiert, und in einem weiteren Schritt konzentriert werden. Dies ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Am Ende der Fermentation kann der Faltungsvorgang noch nicht zu 100% abgeschlossen sein. Durch Zugabe von Mercaptan oder z.B. Cysteinhydrochlorid kann der Vorgang abgeschlossen werden. Dies ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Im folgenden wird die Erfindung durch die Beispiele näher beschrieben, ohne sich darauf zu beschränken.

Beispiel 1 : Konstruktion einer Expressionskassette, die ein Fusionsprotein aus Leu –Hirudin (Refludan) – Arg-Miniproinsulin kodiert

Ausgangsmaterialien sind die Plasmide pK152 (PCT/EP00/08537), pSW3 (EP-A 0 347 781) und das Derivat des rekombinanten Hefepiasmides , das für Rinderinterleukin 2 kodiert (Price etal. Gene 55, 1987). Das Hefeplasmid zeichnet sich dadurch aus, daß es die α - Faktor Leader Sequenz unter Kontrolle des Hefe – ADH2 – Promotors trägt. Angeschlossen über eine KpnI – Restriktionsenzymerkennungsstelle findet sich die cDNA – Sequenz für Rinderinterleukin 2, die im nicht translatierten 3' - Ende nach Manipulation eine für den Vektor singuläre Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym NcoI enthält. Somit kann die cDNA Sequenz über KpnI / NcoI – Spaltung leicht aus dem Plasmid entfernt werden. Da gute Expressionsausbeuten beschrieben werden , kann man davon ausgehen , daß die verbleibende 3'-Interleukin2 Sequenz stabilisierend (als T) auf die mRNA wirkt und somit nicht ausgetauscht werden muß. Das Plasmid pK152 trägt die DNA Sequenz, die für Leu – Hirudin (Refludan) kodiert und das Plasmid pSW3 trägt die DNA – Sequenz für Miniproinsulin. Die Gensequenz, die Hirudin – Lys Arg –Miniproinsulin kodieren soll, wird zunächst mittels PCR –

Technologie hergestellt. Dazu werden 4 Primer mit Hilfe des ExpediteTM DNA Synthese Systems hergestellt :

i. hir_insf1 (SEQ ID NO: 1, kodierter Proteinabschnitt: SEQ ID NO: 2)

5

I P E E Y L Q Arg F V N Q H L C
 5' - ATCCCTGAGGAATACCTTCAG CGA TTTGTTAACCAACACTTGTGTGG - 3'
 59 60 61 62 63 64 65 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7

10 ii. hir_insrev1 (SEQ ID NO: 3)

5' - CCTCACAAGTG TTGGTTAACA AA TCG CT GAAGGTATTC CTCAGGGAT - 3'

iii. hif1 (SEQ ID NO: 4, kodierter Proteinabschnitt: SEQ ID NO: 5)

15

L T Y T D C
 5' - TTTTTTTGGATCCTTTGGATAAAAGACTTACGTATACTGACTGCAC

iv. insnco1rev (SEQ ID NO: 6)

20

5' - TTTTTTCCAT GGGTCGACTATCAG

Primer hir_insf1 beschreibt den Übergang der Codone für die letzten Aminosäuren des Hirudin (59 – 65) über das Brückenglied Arg (Kodon fett gedruckt) zu der Inulinsequenz B1 – B7. Primer hir_insrev1 ist dazu 100% komplementär. Primer hif1 kodiert für den Anfang des Hirudingens verlängert bis zu der KpnI – Schnittstelle wie in EP-A 0 324 712 beschrieben. Primer insncoirev markiert das 3'-Ende des synthetischen Mini- Proinsulins gemäß EP-A 0 347 781.

30 Zwei Standard Polymerasekettenreaktionen werden mit den Primerpaaren hif1/ hir_insrev1 mit DNA des Plasmides pK152 als Template und hir_insf1 / insncoirev mit DNA des Plasmides pSW3 als Template durchgeführt. Die Reaktionen werden in 100µl PCR – Puffer mit jeweils 200nMol Primer und 1µl Polymerase und 100ng Vektor durchgeführt. Schritt 1 besteht aus einer 2 - minütigen Inkubation bei 95°C.

Dann folgen 25 Zyklen der Form 30'' bei 95 °C, 30'' bei 55 °C und 30'' bei 72 °C. Nach dem letzten Zyklus wird 3 Minuten bei 72 °C inkubiert und anschließend die Reaktion gestoppt. Da die Primer hir_ insrevkr und hir_ insfkr zu 100% komplementär sind, überlappen die DNA – Produkte der beiden Produkte entsprechend dieser Sequenz, so daß in einer dritten Reaktion mit den Produkten aus den beiden ersten Reaktionen als Template und den Primer hirf1 und insncoirev ein DNA – Fragment bildet, das Hirudin und Miniproinsulin getrennt durch Arg, kodiert. Das PCR – Fragment wird mit den Enzymen KpnI und NcoI verdaut und anschließend in den KpnI / NcoI geöffneten Vektor p α ADH2 in einer T4 – Ligasereaktion eingesetzt. In Analogie zu Beispiel 7 aus EP-A 0 347 781 werden anschließend kompetente Zellen des E. coli Stammes MM294 mit dem Ligationsgemisch transformiert. Zur Charakterisierung mittels DNA – Sequenzanalyse wird anschließend aus zwei Klonen Plasmid – DNA isoliert. Nach Bestätigung der insertierten DNA – Sequenz wird DNA einer Plasmidpräparation dazu verwendet entsprechend dem genannten Beispiel, Zellen des Bäckerhefestammes Y79 zu transformieren. Zum Unterschied wird aber bei Verwendung des p α ADH2 Vektors auf Komplementation der trp1-1 Mutation nach Einführung des Vektors selektioniert. Zur erneuten Kontrolle wird aus Hefetransformanten Plasmid DNA reisoliert und mittels Restriktionsanalyse analysiert. Der konstruierte Expressionsvektor erhält die Bezeichnung pADH2Hir_Ins. Die Expression erfolgt gemäß Beispiel 4. Man findet das Fusionsprotein im Überstand.

Beispiel 2 : Konstruktion einer Expressionskassette, die ein Fusionsprotein aus Leu –Hirudin (Refludan) – Gly Asn Ser Ala Arg - Miniproinsulin kodiert

Das Beispiel demonstriert einen Weg zur Modifikation der Trypsinerkennungsstelle zwischen dem Hirudin-derivat und Miniproinsulin. Die Konstruktion erfolgt gemäß Beispiel 1.

Zwei neue Oligonukleotide werden synthetisiert :

Hir_insf (SEQ ID NO: 7, kodierter Proteinabschnitt: SEQ ID NO: 8)

G N S A R F V N Q H L C

5' ATCCCTGAGGAATACCTTCAGGGAAATTCGGCACGATTTGTTAACCAACACTTGTGTGG
3'

5

Hir₆₅

B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7

Hir_insrev (SEQ ID NO: 9)

5' CCACACAAGTGTGGTTAACAAATCGTGCCGAATTTCCCTGAAGGTATTCCTCAGGGAT

10

B2 B1

Hir₆₅

Zwei Polymerasekettenreaktionen werden mit den Primerpaaren hirf1/ hir_insrev1 mit DNA des Plasmides pK152 als Template und hir_insf1 / insncoirev mit DNA des Plasmides pSW3 als Template durchgeführt. In einer dritten Reaktion mit den Produkten aus den beiden ersten Reaktionen als Template und den Primer hirf1 und insncoirev ein DNA – Fragment bildet, das Hirudin und Miniproinsulin getrennt durch das Brückenglied Gly Asn Ser Ala Arg kodiert. Das Produkt aus PCR3 wird mit KpnI und NcoI nachgespalten und den entsprechend geöffneten Vektor pαADH2 eingeführt und entsprechend Beispiel 1 charakterisiert. Das Plasmid erhält die Bezeichnung pADHH_GNSA_Ins. Zellen werden mit DNA des Plasmides transformiert. Die Expression erfolgt gemäß Beispiel 3. Man findet das Fusionsprotein im Überstand.

25

Beispiel 3 : Expression der rekombinanten Produkte im Bäckerhefesystem

Die Expression gliedert sich in zwei Phasen. Zunächst wird eine Vorkultur in Hefeminimalmedium angezogen. Das Medium hat pro Liter die Zusammensetzung :

30

6,7g	-	Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)
5,0g	-	Casamino acids (frei von Vitamin)
0,008 %	-	Adenin
0,008%	-	Uracil
2%	-	Glukose

35

Die Haupt – bzw. Expressionskultur wird mit einem Aliquot der Vorkultur beimpft.

Das Medium der Hauptkultur enthält pro Liter :

5	10g	- Yeast Extract
	20g	- Peptone
	0,008%	- Adenin
	0,008%	- Uracil
	4 %	- Glukose

10

Unter Verwendung der beschriebenen Medien wird die Expression im Schüttelkolben so durchgeführt, daß 0,3 ml einer Vorkultur, die über Nacht angezogen wurde, mit 80ml vorgewärmtes Medium verdünnt wird und ca. 24h unter starkem Schütteln bei 30°C inkubiert wird. Je 1ml der so entstandenen Kultur wird dann nach Bestimmung der optischen Dichte zentrifugiert und der Überstand nach Abtrennen der Zellen lyophilisiert und mittels SDS –PAGE analysiert. Zur Bestimmung des Gehaltes an biologisch aktivem Hirudin wird ein Trombinhemmtest durchgeführt. Ein alternatives Fermentationsprotokoll sieht das Abtrennen der Zellen durch Filtration oder vorsichtige Zentrifugation vor. Während aus dem Medium Wertprotein isoliert wird, werden die Zellen mit frischem vorgewärmten Medium der Hauptkultur, das als Kohlenstoffquelle Alkohol und maximal bis 0,5% Glukose enthält versorgt und so die Fermentation kontinuierlich weitergeführt. Dieser Schritt kann bis zu 5 mal wiederholt werden.

25

Beispiel 4. Klonierung und Expression des Hirudin – Arg-Miniproinsulin – Fusionsproteins im P. pastoris – System

Die Firma Invitrogen vertreibt kommerziell einen Klonierungs und Expressionskit zur Herstellung rekombinanter Proteine mit Hilfe des P. pastoris System. Dabei wird ein genaues Arbeits bzw. Technikprotokoll bzgl. der Herstellung und und anschließenden Expression eines P. pastoris Systems zur Produktion eines gewünschten rekombinanten Proteins geliefert, so daß, wenn man diesen Protokollen folgt, nur die Konstruktion des das gewünschte Protein kodierenden

30

Bestandteil des Kits ist der Vektor pPICZ α A . Öffnet man den Vektor mit den Restriktionsenzymen XhoI und SacII, so kann man ein Protein von Interesse ähnlich Beispiel 1 an die alpha – Faktor Leader Sequenz anschließen und auf Sekretion in den Überstand testen. Zur Klonierung des Fusionsproteins werden zwei Primer benötigt. Primer pichia_H_If1 (SEQ ID NO: 10) hat die Sequenz :

10 5' - TTTTTTCTCGAGAAAAGA CTTACGTATACTGAC - 3'
XhoI Hir₁ Hir₂ usw.

Primer pichia_H_Irev2 (SEQ ID NO: 11) hat die Sequenz:

15
5' - TTTTTTGGCGCCGAATTCACTATTAGTTACAGTAGTTTTC-3'
SacII EcoRI A21

Als Template verwendet man DNA des Plasmides pADH2Hir_Ins. Führt man eine Standard PCR mit beiden Primern aus, so erhält man ein DNA –Produkt, daß die Sequenz Hirudin-ARG –Miniproinsulin verlängert um die XhoI und SacII Integrationsstelle enthält. Spaltet man das DNA – Produkt entsprechend und isoliert das Fragment, so kann es in einer T4 – DNA Ligase Reaktion in die geöffnete Vektor – DNA eingesetzt werden. Abweichend vom Protokoll der Hersteller wird der in Beispiel1 beschriebene E.coli Stamm MM294 mit dem Ligationsgemisch transformiert und auf Zeocin – Selektionsplatten rekombinante Kolonien gesucht. Plasmid DNA wird von Klonen reisoliert und anschließend mittels Restriktions – und DNA – Sequenzanalyse charakterisiert. Entsprechend der Angaben der Hersteller wird dann unter Verwendung des so konstruierten Plasmides ein P. pastoris Expressionsklon zur Produktion des Fusionproteins hergestellt.

Beispiel 5. Thrombinhemmtest

Die Bestimmung der Hirudinkonzentration wird entsprechend der Methode von Griebach et al. (Thrombosis Research 37, S. 347 –350 , 1985) durchgeführt. Dazu werden definierte Mengen eines Refludanstandards zur Erstellung einer Eichkurve in die Meßreihe mit einbezogen . Damit kann die Ausbeute direkt in mg /l angegeben werden. Die biologische Aktivität ist auch ein direktes Maß für die korrekte Faltung des Proinsulinbestandteils des Fusionsproteins. Alternativ kann ein proteolytischer *S.aureus* Verdau und die anschließende Analyse in einem RP-HPLC – System zur Bestimmung der korrekten S-S -Brückenbildung eingesetzt werden.

Beispiel 6 : Reinigung des Fusionsproteins

Am Ende der Fermentation wird ein pH-Wert von 2,5 –3 eingestellt. Das Fusionsprotein wird überraschend bei einem pH von 2,5 – 3 im Gegensatz zu den meisten übrigen Polypeptiden, die sich im Überstand sei es durch spontane Lyse von Hefezellen oder Sekretion finden, nicht ausgefällt. Das Kulturmedium wird daher entsprechend angesäuert und anschließend nach Abschluß der Fällung wird der Niederschlag und die Zellen abzentrifugiert bzw. durch eine Mikrofiltration abgetrennt und konzentriert. Anschließend wird das Medium auf pH 6,8 eingestellt. Parallel wird über analytische HPLC – Messung der Gehalt an Fusionsprotein bestimmt. Nach der Bestimmung wird dem Überstand Trypsin zugesetzt ,so daß pro 1-1,5 mg Fusionsprotein ca. 1µg Trypsin eingestellt sind. Nach einer Inkubation von ca. 4 Stunden bei Raumtemperatur erfolgt eine Reinigung über Kationentauscherchromatographie bei einem pH von 3,5 und in Gegenwart von 2 – Propanol. Die Elution erfolgt in dem Puffer unter Anlegen eines Gradienten von 0,15 molar bis 0,45 molar. Mono - Arg Insulin eluiert bei ca. 0,3 molar. Nach 1:1 Verdünnung wird aus den Insulin haltigen Fraktionen bei einem pH von ungefähr 6,8 unter Zusatz einer 10% -igen $ZnCl_2$ – Lösung Mono – Arg Insulin ausgefällt. Das Insulin wird abfiltriert und anschließend in 0,05 M Tris-HCL (pH8,5) aufgelöst, so daß eine Lösung von 2mg / ml entsteht: Anschließend wird ungefähr die Menge von einer 1 Einheit Carboxypeptidase B pro 100ml Lösung zugesetzt und unter schwachem Rühren die Reaktion durchgeführt. Anschließend wird ein H von 5,5 mit

Zitronensäure eingestellt und Insulin in Anwesenheit von ZnCl_2 auskristallisiert. Die Kristalle werden abgetrennt aufgelöst und nach einem Reinigungsschritt über RP – HPLC wird Insulin erneut durch Kristallisation gereinigt.

5 Beispiel 8. Prozessierung des Fusionsproteins direkt im Kulturmedium

Am Ende des Expressionsabschnittes wird das Kulturmedium auf pH 6,8 eingestellt und anschließend Trypsin eingerührt, so daß eine Endkonzentration von 4 – 8mg pro Liter eingestellt wird. Nach Inkubation über ca. 4 Stunden wird die so behandelte
10 Fermentationsbrühe auf pH 2,5 – 3 eingestellt. Nach 1- 6 Stunden der Fällung wird der pH auf 3,5 angehoben und in Gegenwart von 30% 2 – Propanol das entstandene Mono – Arg – Insulin wird über Kationentausch – Chromatographie gereinigt . Die Elution erfolgt mittels eines NaCl - Gradienten von 0,05 – 0,5 M Salz. Die produkthaltigen Fraktionen werden 1:1 mit H_2O und anschließend mit ZnCl_2
15 versetzt, so daß eine 0,1% - ige ZnCl_2 Lösung entsteht. Bei einem pH von ca. 6,8 fällt Mono – Arg – Insulin aus. Dies wird beispielhaft entsprechend Beispiel 7 in Insulin umgewandelt.

Patentansprüche :

1. Expressionskassette der Form :

5

$P_x - S_x - B_n - (ZR) - \text{Hir} (A_{sm}R) - \text{Protein} (Y) - T$

wobei

10 P_x einer beliebigen Promotor – DNA - Sequenz, die so ausgewählt wird, das optimale Ausbeuten an Wertprotein erzielbar werden;

S_x einer beliebigen DNA die eine Signal bzw. Leadersequenz, die optimale Ausbeuten erlaubt, kodiert;

B_n 1-15 genetisch Kodierten Aminosäuren oder einer chemischen Bindung ;

15 Z dem Codon einer Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg ;

R einem Codon für Arg oder einer chemischen Bindung ;

A_{sm} einer chemischen Bindung oder mit $m = 1-10$ genetisch kodierbaren Aminosäuren;

20 Hir einer DNA – Sequenz , die für Hirudin oder ein Derivat des Hirudin, das mindesten 40% Homologie zu natürlichem Hirudin aufweist, kodiert;

$\text{Protein } Y$ einer DNA – Sequenz , die ein beliebiges in Hefe herstellbares und sekretierbares Protein kodiert;

T einer nicht translatierten DNA – Sequenz, die sich vorteilhaft auf die Expression auswirkt;

25 entspricht.

2. Expressionskassette gemäß Anspruch 1, wobei Protein (Y) Miniproinsulin oder einem Derivat davon entspricht.

Zusammenfassung

- 5 Verwendung von Fusionsproteinen deren N- terminaler Anteil aus einem Hirudinderivat besteht zur Herstellung rekombinanter Proteine über Sekretion durch Hefen

- Die Erfindung bezieht sich auf eine Expressionskassette der Form $P_x - S_x - B_n -$
 10 (ZR) - Hir ($A_s R$)- Protein (Y) - T , wobei P_x einer beliebigen Promotor – DNA - Sequenz, die so ausgewählt wird, das optimale Ausbeuten an Wertprotein erzielbar werden; S_x einer beliebigen DNA die eine Signal bzw. Leadersequenz, die optimale Ausbeuten erlaubt, kodiert; B_n 1-15 genetisch kodierten Aminosäuren oder einer chemischen Bindung; Z dem Codon einer Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg;
 15 R einem Codon für Arg oder einer chemischen Bindung; A_s einer chemischen Bindung oder mit $m = 1-10$ genetisch kodierbaren Aminosäuren; Hir einer DNA – Sequenz , die für Hirudin oder ein Derivat des Hirudin, das mindesten 40% Homologie zu natürlichem Hirudin aufweist, kodiert; Protein Y einer DNA – Sequenz, die ein beliebiges in Hefe herstellbares und sekretierbares Protein kodiert;
 20 T einer nicht translatierten DNA – Sequenz, die sich vorteilhaft auf die Expression auswirkt; entspricht.